

**ZUR ORGANVERTEILUNG UND AUSSCHIEDUNG
VON TRASYLOL-HOMOLOGEN, AKTIVEN UND
INAKTIVEN INHIBITOREN BEI DER RATTE
NACH INTRAVENÖSER INJEKTION**

Gabriele Stache

1478

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der
Chirurgischen Klinik der Universität München

ZUR ORGANVERTEILUNG UND AUSSCHIEDUNG
VON TRASYLOL-HOMOLOGEN, AKTIVEN UND
INAKTIVEN INHIBITOREN BEI DER RATTE
NACH INTRAVENÖSER INJEKTION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Gabriele Stache
aus
München

München 1977



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Fritz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Fritz
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548315_0006

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.
Dr. H. Fritz für die Überlassung des
Themas und seine für mich sehr hilfreiche
Förderung dieser Arbeit durch entsprechende
Hinweise und Anregungen.

G L I E D E R U N G

	Seite
E I N L E I T U N G	1
T H E O R E T I S C H E R T E I L	4
1. Die wichtigsten Proteasen, die von natürlichen Inhibitoren gehemmt werden	4
a. Trypsin	4
b. Chymotrypsin A und B	5
c. Plasmin	5
d. Kallikrein	5
2. Trasylol ^R	7
E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N	9
I. Meßmethoden	9
1. Prinzip der Trypsinhemmung	9
2. Versuchsmethodik mit Ratten	12
a. Injektion der Inhibitoren und Gewinnung von Blut, Organen und Harn	12
b. Herstellung der Extraktproben	13
3. Zusatz	15
II. Verteilung von Trasylol ^R auf die Organe der Ratte nach i.v. Injektion	16
III. Zur Herstellung, Chemie und Hemmverhalten eines Inhibitors aus Seeanemonen	17
IV. Verteilung des Seeanemoneninhibitors nach i.v. Injektion	23
1. Vorversuche	23
2. Verteilungskurve	24
3. Verteilung in verschiedenen Organen der Ratte	25

V.	Zur Herstellung und Chemie eines Inhibitors aus Schnecken	28
VI.	Verteilung des Schneckeninhibitors nach i.v. Injektion	30
1.	Vorversuche	30
2.	Verteilungskurve	30
3.	Verteilung in verschiedenen Organen der Ratte	31
VII.	Vergleichende Untersuchungen zum Verhalten des Tetrasuccinyl- Trasylool und des modifizierten Tetra- succinyl-Acetyl (N ^ω -Lys ¹⁵) - Trasylool nach i.v. Injektion bei Ratten	34
1.	Theoretische und experimentelle Ergebnisse nach H. Jering	34
2.	In vivo Versuche	36
	ZUSAMMENFASSUNG	39
	DISKUSSION	41
	LITERATURVERZEICHNIS	45
	LEBENS LAUF	

E I N L E I T U N G

Bereits 1930 wurde von KRAUT, FREY und MERLE (1,2) ein polyvalenter Inhibitor in verschiedenen Rinderorganen gefunden, der heute unter dem Handelsnamen T r a s y l o l ^R in der Klinik vielfach verwendet wird.

Dieser Proteinasehemmstoff hemmt die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, sowie Organ- und Plasmakallikreine (3,4).

Aus diesem breiten Wirkungsspektrum des Trasylol läßt sich seine Bedeutung für die therapeutische Anwendung in der Klinik ableiten. Bei Krankheitsbildern wie akuter Pankreatitis, Schock, primären und sekundären Wundheilungsverzögerungen ist die Applikation von Trasylol als Dauertropfinfusion über einen längeren Zeitraum hinweg indiziert.

Dieser polyvalente Inhibitor verläßt relativ schnell die Blutbahn und wird in hoher Konzentration in den Nieren angereichert, ohne in aktiver Form im Harn zu erscheinen (5,6,7).

In der vorliegenden Arbeit wird die Verteilung und Ausscheidung verschiedener anderer Inhibitoren nach intravenöser Injektion bei Ratten untersucht. Es handelt sich dabei im einzelnen um folgende Substanzen:

- 1) Polyvalenter Inhibitor aus Seeanemonen, reagierend mit Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein,
- 2) Polyvalenter Inhibitor aus Schnecken mit hoher Affinität zu Trypsin, Plasmin und Chymotrypsin,
- 3) Modifizierte Inhibitoren:
 ϵ - Acetyl - Lys¹⁵ (tetrasuccinyl) -
Trasylol (inaktiv) und Tetrasuccinyl-
Trasylol (aktiv)

Der modifizierte Lys - 15 - Rest liegt im reaktiven Zentrum des Trasylol und seine ϵ - Aminoseitenkette ist deshalb für die Komplexbildung mit Trypsin von besonderer Bedeutung. Diese Aminogruppe wurde durch Acetylierung, Acetoacetylierung und Succinilierung derivatisiert und die entsprechenden Derivate gereinigt. Alle Derivate waren gegen Trypsin i n a k t i v .

Die an ϵ - Aminogruppen von Lysinresten gebundene Acetylgruppe läßt sich enzymatisch in vitro und in vivo abspalten. (8)

Das zur Deacylierung der Acetylgruppe notwendige Enzym wurde aus Schweinenieren angereichert.

Vergleichende Untersuchungen über die Verteilung und Ausscheidung dieser Hemmstoffe sollen zur Klärung der Frage beitragen, warum sich der polyvalente Proteinaseinhibitor aus Rinderorganen in der Niere anreichert und im Harn nur inaktive Abbauprodukte erscheinen.

THEORETISCHER TEIL

1. Die wichtigsten Proteasen, die von natürlichen Inhibitoren gehemmt werden:

a. Trypsin

Dieses Enzym findet man im Pankreas, wo es als inaktive Vorstufe "Trypsinogen" gebildet und gespeichert wird. Die Aktivierung des Trypsinogen erfolgt durch Abspaltung eines Hexapeptids: Val - Asp - Asp - Asp - Asp - Lys (9). Als Katalysatoren dieses Vorgangs wirken Trypsin oder andere Enzyme, wie zum Beispiel Enterokinase aus der Mukosa des Duodenums.

Das Molekulargewicht von Trypsin liegt bei 24.000, sein pH - Optimum bei 7 - 8. Trypsin spaltet Lysyl - und Arginylbindungen der Peptidkette, sowie synthetische Aminosäure-ester - und - amide.

Enzyme mit trypsinähnlicher Substratspezifität lassen sich u. a. in den Leukozyten (10), im

Serum (11), im Harn (12) und in der Plazenta (13) nachweisen.

b. Chymotrypsin A und B

Chymotrypsin kommt im Pankreassaft in den beiden Vorstufen Chymotrypsinogen A und B vor. Zur Umwandlung in die aktive Form des Chymotrypsin ist Trypsin nötig. Das Molekulargewicht beträgt 25.000.

c. Plasmin

Plasmin findet sich als inaktive Vorstufe Plasminogen im Blut. Seine Wirkungsspezifität ist ähnlich der des Trypsin. In seiner aktiven Form dient es dazu, Blutgerinnsel abzubauen. Das Molekulargewicht beträgt 83500.

d. Kallikrein

1925 wurde von FREY (14) zum ersten Mal im Harn

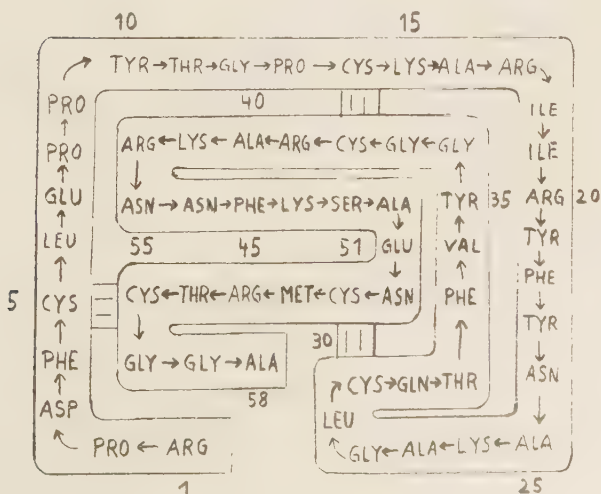
eine blutdrucksenkende Substanz beschrieben, die später von FREY, KRAUT und WERLE in wesentlich höherer Konzentration auch im Pankreas nachgewiesen werden konnte. Diese Substanz wurde nach der griechischen Bezeichnung für die Bauchspeicheldrüse "Kallikreas" Kallikrein benannt (15). Später entdeckten WERLE et al. weitere Kallikreine im Serum und in der Submandibularisdrüse (15). Die Kallikreine des Pankreas und des Plasmas ließen als inaktive Vorstufen, als sogenannte Praekallikreine, vor (16).

Die Kallikreine sind Enzyme mit proteolytischer und esterolytischer Aktivität, die aus inaktiven Serumvorstufen (Substraten) blutdrucksenkende und darmkontrahierende Substanzen, die Kinine, freisetzen. Diese natürlichen Substrate sind die Serum und in der interstitiellen Flüssigkeit vorkommenden Kininogene. Die Kininogene des menschlichen Serums sind Globulineder alpha₂ - Fraktion (17), während die Kininogene des Rinderplasmas zur alpha₁ - Fraktion gehören (18,19).

Von den biogenen Aminen, die eine vergleichbar hohe pharmakologische Wirksamkeit besitzen, unterscheiden sich die Kinine dadurch, daß sie nicht schon in vollständig aktiver Form vorliegen, sondern erst enzymatisch aus der inaktiven Vorstufe freigelegt werden müssen.

2. Trasylol^R

Trasylol ist ein polyvalenter Proteinase-inhibitor aus Rinderorganen, dessen Aminosäuresequenz von LASKOWSKI und Mitarbeitern bzw. von ANDERER aufgeklärt wurde (20):



Das basische Polypeptid ist aus 58 Aminosäuren zusammengesetzt und hat ein Molekulargewicht (21) von 6513. Der isoelektrische Punkt liegt bei 10,5. Durch schwache Säuren und Temperaturen bis 60 ° C löst sich der Inhibitor nicht denaturieren. Pepsin und die Proteinase des Pankreas greifen ihn, im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinaseinhibitoren, nicht an. In eiweißfällenden Reagentien wie zum Beispiel Trichloressigsäure, 70 % Äthanol mit Eisessig und Perchlorsäure bleibt er gelöst. Durch Zugabe von Harnstoff kann eine partielle Denaturierung erzielt werden, die reversibel ist (22).

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

I. Meßmethoden

1. Prinzip der Trypsinhemmung

Es wurde die Trypsinbestimmungsmethode mit BAPA als Substrat durchgeführt (23). Man läßt nebeneinander Trypsin, als Bezugswert, und Trypsin mit Inhibitorlösung, als Hemmansatz, auf BAPA als Substrat einwirken. Es tritt eine Gelbfärbung ein, die die Freisetzung von p-Nitroanilin anzeigt, das durch Spaltung der Säureamidbindung entsteht. Die Extinktion der Lösung wird bei 405 nm gemessen. Die Zunahme der Farbintensität ist proportional zur Trypsinaktivität.

Reagenzien

a. Trypsin

5 mg Rindertrypsin (Trypure Novo ^R, Calcium-stabilisiert) werden in 100 ml Aqua bidest. oder in 0,002 N Salzsäure gelöst und bei

0 - 4 ° C aufbewahrt.

b) 0,2 M Tra - puffer, pH = 7,8

c) BAFA: 100 mg BAFA (Fluka) werden in 100 ml Aqua bidest. in kochendem Wasserbad gelöst.

Die Trypsinbestimmung mit Hilfe von BAFA ist allen anderen Methoden in der Spezifität und in der schnellen und guten Reproduzierbarkeit bei weitem überlegen.

Messung

eBstrahl 405 nm; Schichtdicke 1 cm; Küvettenvolumen 3,0 ml; Reftemperatur 25 ° C.

Ansätze

1) Bezugswert: 0,2 ml Trypsinlösung (a)
+ 1,8 ml TRA-Puffer (b)

2) Hemmansatz: 0,2 ml Trypsinlösung (a)
+ bis zu 0,5 ml Inhibitorlösung + TRA-Puffer (b)

auf 2 ml auffüllen.

Beide Ansätze 5 Minuten inkubieren. Dann wird in jede Küvette 1 ml PAPA-Lösung (c) einpipetiert. 5 Minuten lang wird nun die Extinktionsänderung pro Minute gemessen.

Berechnung

Eine Enzymmillieinheit (mE) entspricht bei diesem Trypsinhemmtest einer Extinktionsdifferenz von $E = 0,00332$ pro Minute (TRAUTSCHOLD, I., Habilitationsschrift, Universität München 1965).

Nach Subtraktion der Extinktionsänderung pro Minute der Hemmansatzes von der Extinktionsänderung pro Minute des Bezugswertes errechnet man die in der Testprobe enthaltenen ImU nach der Formel:

$$\text{ImU/Probe} = \frac{\Delta E_{\text{Bez}} - \Delta E_{\text{Hemm.}}}{0,00332}$$

sind über 70 % des vorgelegten Trypsins gehemmt, so muß man die Messung mit einer größeren Verdünnung der Inhibitorlösung wiederholen, da jenseits von 70 % die Hemmung nicht mehr proportional der InhibitorKonzentration ist (23).

2. Versuchsmethodik mit Ratten

a. Injektion der Inhibitoren und Gewinnung von Blut, Organen und Harn

Männlichen Albinoratten wurden nach dem Wiegen möglichst konzentrierte Inhibitorlösungen (in physiologischer Kochsalzlösung, ca. 0,5 - 1,0 ml) in die Schwanzvene injiziert.

Nach den in den Tabellen angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere durch Dekapitation entblutet, die Organe extirpiert und sofort aufgearbeitet oder bei -20°C eingefroren. Bei den Ratten, die 3, 4, 8, 12, 24 oder 48 Stunden nach der

Injektion getötet wurden, wurde in dieser Zeit der ausgeschiedene Urin gesammelt.

b) Herstellung der Extraktproben (24)

Das nach Zentrifugieren des Blutes gewonnene Serum wurde mit demselben Volumen 6 % - iger Perchlorsäure (Endkonzentration 3 %) versetzt. Der beim Ansäuern ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert, die saure Lösung mit 5 M K_2CO_3 - Lösung neutralisiert und das unlösliche Kaliumperchlorat nach kurzem Stehen der Proben bei 0 ° C abzentrifugiert. Der neutrale Überstand wurde zur Bestimmung der Inhibitorkonzentration verwendet.

Die Organe, bzw. Teile davon, wurden nach Zugabe von 1 ml Wasser (dest.) und 2 ml 6 % - iger Perchlorsäure pro Gramm Gewebe unter Kühlung (0 - 4 ° C) homogenisiert (Ultra-Turrax, JANKE und KUNKEL, 20.000 U/Min. und Ultraschallgerät, BRANSON SONIC POWER, USA).

Die unlöslichen Gewebsbestandteile wurden abzentrifugiert, der Überstand mit 5 M K_2CO_3 neutralisiert, das ausgefallene Kaliumperchlorat abzentrifugiert und die neutralen Extrakte zum Trypsinhemmtest eingesetzt.

Die Bestimmung der Inhibitorkonzentration im Harn erfolgte ohne weitere Vorbehandlung, da sie sich durch Enteiweissen des Harns nicht veränderte. Bei hohem Inhibitorgehalt wurde lediglich verdünnt mit Aqua dest. oder physiologischer Kochsalzlösung.

Die Verdünnung bei den Organextrakten wurde durch Multiplikation der gefundenen Inhibitormengen mit dem Verdünnungsfaktor (Serum: 2, Organe: 4) berücksichtigt.

Zur Berechnung der Inhibitormenge im Blut wurden folgende Faktoren verwendet:

6,7 ml Blut entsprechen 3,7 ml Serum pro
100 g Körpergewicht bei Ratten.

3. Zusatz

Zu allen Tierversuchen wurden männliche Albinoratten mit einem Gewicht zwischen 280 u. 320 g verwendet.

Trasyol^R, Bayer Leverkusen, die Ampulle zu 100.000 KIE in 10 ml wurde zur Injektion und als Vergleichswert bei Hemmversuchen benutzt.

II. Verteilung von Trasylol^R auf die Organe der Ratte nach i.v. Injektion

Nach i.v. Injektion von Trasylol fällt die Inhibitorkonzentration im Serum schon nach kurzer Zeit stark ab. Spritzt man bei einer Ratte 3000 ImU i.v., so findet man nach 3 Minuten bereits nur noch 20 % der gespritzten Gesamtmenge im Blut, nach einer halben Stunde sind nur noch ca. 4 % im Blut vorhanden.

Nach dem schnellen Inhibitorabfall im Blut setzt ein langsamer Anstieg der Inhibitor-konzentration vor allem in den Nieren ein, wo nach einer Stunde 60 % des Inhi-bitors zu messen sind.

In der Leber fanden sich nach einer Stunde ca. 15 %, in der Lunge ca. 5 % (vgl. 25).

III. Zur Herstellung, Chemie und Hemmverhalten eines Inhibitors aus Seeanemonen

Die Seeanemone "Anemonia sulcata" besitzt hochwirksame Giftstoffe, mit denen sie ihre Beute lähmt. Nach Untersuchungen von L. u. R. Béress (26) handelt es sich bei diesen basischen Neurotoxinen um Polypeptide bzw. Proteine im Molekulargewichtsbereich von 5000 - 10000. Im Rahmen der Isolierung dieser Toxine fand L. Béress auch sehr wirksame Inhibitoren für Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikreine in den Extrakten aus *Anemonia sulcata*:

Aus wässrig-alkoholischen Extrakten von *Anemonia sulcata* wurde durch fraktionierte Fällung, Chromatographie an CM-Sephadex C-50 und Sephadex G-50 ein Gemisch basischer, polyvalenter Isoinhibitoren isoliert (27). Die Isolierung gelang auch direkt aus wässrigen Extrakten durch selektive Bindung der Inhibitoren an wasserunlösliche Trypsin-Celluloseharze und anschließende Dissoziation der gewaschenen

Komplexe in schwachsaurer Lösung.

Das Inhibitorgemisch konnte durch Gleichgewichts- und Gradientenchromatographie an CM - Cellulose - Säulen in 5 Isoinhibitoren aufgetrennt werden, deren Aminosäurezusammensetzungen aus der folgenden Tabelle zu ersehen sind (27):

Vergleich der Aminosäureanalysenwerte der verschiedenen Isoinhibitoren des Proteaseinhibitors aus Seeanemonen:

Die Analysenwerte der polyvalenten Proteaseinhibitoren aus Rinderorganen BPTI und Rindercolostrum CTI (Fraktion B⁽¹²⁾) sind ebenfalls angegeben.

Fraktion	Ausgangsmischung ^a	A	B	C _{2a}	C _{4b}	D ^b	BPTI	CTI
Asp	6,00	6	6	6	6	6	5	8
Thr	1,12	1	1	1	1	1	3	6
Ser	3,84	5	5	4	3	4	1	3
Glu	4,95	5	5	5	5	4	3	10
Pro	2,84	3	3	3	2	2	4	7
Gly	6,47	6	6	7	7	6	6	4
Ala	2,04	2	2	2	2	2	6	4
Cys	5,69	6	6	6	6	6	6	6
Val	2,84	4	4	4	4	4	1	0
Met	< 0,02	0	0	0	0	0	1	1
Ile	1,66	2	2	2	2	1	2	1
Leu	2,44	2	2	2	3	2	2	5
Tyr	3,72	3	3	3	3	3	4	3
Phe	2,71	2	2	3	3	3	4	4
Lys	3,83	4	4	4	3	3	4	2
His	1,25	2	2	1	1	1	0	0
Arg	5,83	5	5	6	7	6	6	3
Trp	0,13	0	0	0	0	0	0	0
Summe		58	58	59	58	54	58	67
Mol.-Gew		6484 ^c	6484 ^c	6620 ^c	6577 ^c	6095 ^c	6513	7520 ^{c, d}

^a Gemisch der Isoinhibitoren (1,1 IU/mg), Werte einer 20-h-Hydrolyse;

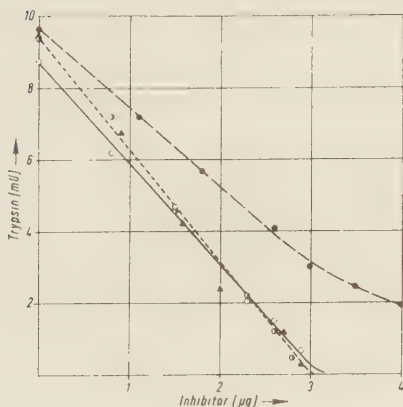
^b Chromatographisch noch nicht einheitlich

^c Ohne Berücksichtigung des Amidierungsgrades;

^d Ohne Berücksichtigung des Kohlehydratanteils.

Die Isoinhibitoren der Seeanemone besitzen dasselbe Hemmspektrum wie der basische Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Trasylol, BPTI) des Rindes:

Sie sind neben BPTI die einzigen natürlich vorkommenden Proteaseinhibitoren, die außer Trypsin, Plasmin, α - Chymotrypsin und Serum-Kallikrein auch Organ-Kallikrein hemmen. Abb. 1 (27):



Titration von Trypsin mit den Isoinhibitoren B, C_{2a} und C_{4b} aus Seeanemonen sowie mit dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor vom Rind (BPTI)

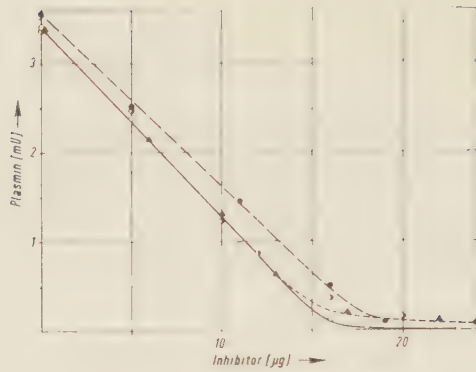


Abb. 2 (27): Titration von Plasmin mit den Inhibitoren B, C_{2a}, C_{4b} und BPTI

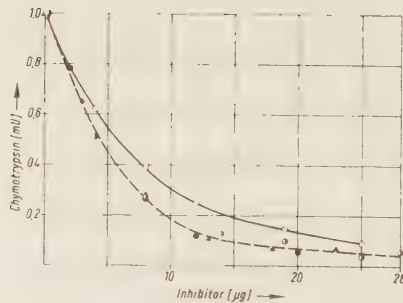


Abb. 3 (27): Titration von Chymotrypsin mit den Inhibitoren B, C_{2a}, C_{4b} und BPTI

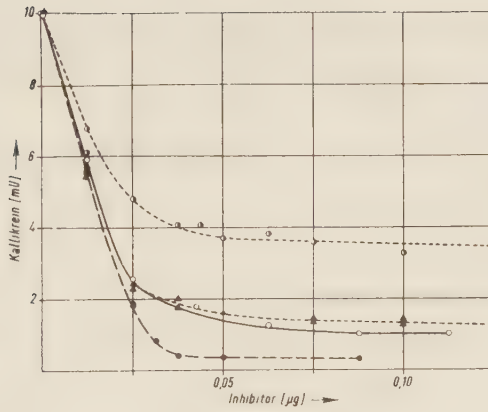


Abb. 4 (27): Titration von Kallikrein aus Schweinepankreas mit den Inhibitoren B, C_{2a}, C_{4b}, und BPTI

Eine weitere Gemeinsamkeit liegt im Verhalten des Bienenmonen-Inhibitors und des BPTI gegenüber Subtilisin und Thrombin:

Die Aktivitäten beider Proteasen werden durch diese Hemstoffe nicht vermindert.

Über die physiologische Funktion des Bienenmonen-Inhibitors können nur Vermutungen geäußert werden. Der Verdauungstrakt der Biene enthält, ähnlich wie das Pankreas höherentwickelter Spezies, Zymogengranula, aus denen nach autokatalytischer Aktivierung eine chymotrypsin-ähnliche Protease isoliert wurde(28). Möglicherweise dient der Inhibitor dazu, das körpereigene Gewebe vor der Wirkung seiner Verdauungsproteasen zu schützen.

IV. Verteilung des Secanemonen-Inhibitors nach i.v. Injektion

1. Vorversuche:

In Vorversuchen wurde mit der bereits beschriebenen Methode die Hemmstoffkonzentration in den Organen unbehandelter Tiere ermittelt.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse:

Nieren	12 ImU / g
Leber	3 ImU / g
Lunge	3 ImU / g
Milz	1 ImU / g
Serum	15 ImU / ml
Harn	0 ImU / ml

Tabelle

Inhibitor-Konzentration in den Organen, im Serum und im Harn von Ratten, denen kein Inhibitor injiziert wurde. (Mittelwert aus 6 Bestimmungen - Größenordnung stimmt mit bereits vorliegenden Untersuchungen überein)(vgl. 29).

2. Verteilungskurve



3. Verteilung in verschiedenen Organen der Ratte

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Injektion von 3000 ImU/g Seeanemonen-Inhibitor wurde der Hemmstoffgehalt der Nieren, der Leber, der Lunge, der Milz, des Serums und des Harns von Ratten bestimmt.

Alle Werte geben die tatsächlich der Inhibitor-Injektion entstammenden Inhibitormengen wieder. Die auch ohne Inhibitorapplikation vorhandene Hemmstoffkonzentration in den Organen (siehe Tabelle) ist bereits abgezogen.

a) Die Nieren weisen nach 15 Minuten 4 - 5 %, nach 30 Minuten 5,5 % und nach 1 Stunde 3,4 und 6,5 % der inj. Hemmstoffmenge auf. Bei den gewählten Meßzeiten tritt ein Inhibitorkonzentrationsmaximum von 20 % nach 3 Stunden auf. Von da an ist ein kontinuierlicher Abfall auf ca. 2 % nach 8 Stunden und auf 0 % nach 12 Stunden zu beobachten.

b) In den Organen Leber, Lunge und Milz liegen die Werte zu allen Zeitpunkten unter 1 - 2 % der injizierten Inhibitormenge.

c) Im Serum war die Inhibitorkonzentration 1 Stunde post injectionem bereits auf 8 und 14,5 % abgefallen. Die Werte nach 3 Stunden lagen bereits bei 2 und 3 %, es folgt ein kontinuierlicher Abfall auf 0 % nach 8 Stunden.

d) Im Harn erschienen nach 3 Stunden zunächst - 3 %. Es folgt ein Anstieg auf 16, 20, 22 und 27 % nach 8 Stunden, auf 40 % nach 12 Stunden und auf 47 und 53 % nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden war eine Harnstoffkonzentration von 24, 24,6 und 28,5 % im Harn meßbar.

Tabelle:

Zeit	% der injizierten Aktivität in			
	Nieren	Serum	Harn	Summe
15 min	4,2	-	-	4,2
30 min	5,5	-	-	5,5
1 Std	4,5	11,4	-	15,9
5 Std	18,0	2,5	2,5	23,0
8 Std	1,2	0,2	1,7	3,1
12 Std	-	-	40,0	40,0
24 Std	-	-	50,0	50,0
48 Std	-	-	35,7	35,7

Tabelle

Mittelwerte der in den Organen und im Serum zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Injektion von 3.000 ImU Seeanemonen-Inhibitor wiedergefundenen Inhibitoraktivität, ausgedrückt in % der injizierten Aktivität (= 100 %).

V. Zur Herstellung und Chemie eines Inhibitors aus Schnecken

Seit 1958 ist das Vorhandensein eines Inhibitors für Trypsin und Kallikrein im Blutserum der Weinbergschnecke bekannt (30).

1971 fand der Hämatologe R. Larx in Rohextrakten des Zwittertieres Schnecke Hemmaktivitäten gegenüber Trypsin und Plasmin.

H. Fritz stellte in den Rohextrakten roter und schwarzer Nacktschnecken zusätzlich eine Hemmung von Chymotrypsin und Pankreaskallikrein fest.

Bei der Isolierung und Charakterisierung polyvalenter Proteasen-Inhibitoren aus Weinbergschnecken (31,32) fand T. Dietl zwei Inhibitor-typen:

- 1) einen hochmolekularen, säureinstabilen Trypsin-Plasmin-Inhibitor, der nicht an das Trypsinharz gebunden wurde, bei der Fällung mit Ammoniumsulfat in Lösung blieb und antigen wirksam ist (33);

- 2) eine Gruppe von Isoinhibitoren, die säure- und hitzestabil waren, von Trypsinharz gebunden wurden, zusätzlich, wenn auch unterschiedlich stark, Chymotrypsin und Kallikrein hemmen und keine antigene Wirkung besitzen (34).

Aus dem weitgehend aufgetrennten säurestabilen Inhibitorgemisch wurden drei Isoinhibitoren isoliert und zwei davon als permanente Trypsin-Inhibitoren charakterisiert.

Sie bestehen aus 58 Aminosäureresten, besitzen drei Disulfidbrücken, ein Molekulargewicht um 6500 und einen Argininrest im reaktiven Zentrum. Die Dissoziationskonstante des Trypsin-Inhibitor-Komplexes liegt bei 10^{-9} - 10^{-10} Mol/l (34).

VI. Verteilung des Schneckeninhibitors nach i.v. Injektion

1. Vorversuche (Vgl. die Versuche unter IV.1.)

2. Verteilungskurve:



3. Verteilung in verschiedenen Organen der Ratte

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Injektionen von 3000 mIU Schnecken-Inhibitor wurde der Hemmstoffgehalt der Nieren, der Leber, der Lunge, der Milz, des Serums und des Harns von Ratten bestimmt.

Bei den angegebenen Inhibitor-Konzentrationen sind die "Leerwerte" bereits wieder abgezogen.

a) In den Nieren finden sich nach 1 Stunde 14 %, nach 3 Stunden 13 %, nach 5 Stunden nur noch 3 %, nach 8 Stunden 1,5 % der injizierten Inhibitoraktivität. Nach 12 Stunden ist keine Inhibitoraktivität mehr nachweisbar in den Nieren.

b) In der Leber waren im Zeitraum von 1 - 3 Stunden lediglich 1,5 % der injizierten Inhibitoraktivität meßbar.

c) In den Organen Lunge und Milz lag die meßbare Hemmstoffkonzentration jeweils unter 1 % der injizierten Inhibitormenge.

d) Im Serum fanden sich nach 1/4 Stunde 22 %, nach 1/2 Stunde 15,5 %, nach 1 Stunde 2,5 % und nach 3 Stunden nur noch 1 % der injizierten Inhibitoraktivität. Nach 5 Stunden ist keine über den Leerwert hinausgehende Hemmwirkung mehr meßbar.

e) Die erste meßbare Inhibitoraktivität im Harn liegt nach 3 Stunden bei 2 % der injizierten Inhibitormenge. Anschließend ist ein fast kontinuierlicher Anstieg über 25 % nach 8 Stunden, 32,5 % nach 13 Stunden, 64 % nach 24 Stunden bis zu 86 % nach 48 Stunden meßbar.

Tabelle:

Zeit nach Injekt.	% der injizierten Aktivität (nach Abzug der Leerwerte) in			
	Nieren	Serum	Harn	Summe
15 Min.	-	22,0	-	22,0
30 Min.	-	15,5	-	15,5
1 Std.	14,0	2,5	-	16,5
3 Std.	13,0	1,0	2,0	16,0
5 Std.	3,0	-	-	-
8 Std.	1,5	-	25,0	26,5
13 Std.	-	-	32,0	32,0
24 Std.	-	-	64,0	64,0
48 Std.	-	-	86,0	86,0

Tabelle

Mittelwerte der in den Organen und im Serum zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Injektion von 3000 mIU Schneckeninhibitor wiedergefundenen Inhibitoraktivität, ausgedrückt in % der injizierten Aktivität (= 100 %).

VII. Vergleichende Untersuchungen zum Verhalten des Tetrasuccinyl-Trasylol und des modifizierten Tetrasuccinyl-Acetyl (N^ε-Lys¹⁵) - Trasylol nach i.v. Injektion bei Ratten

1. Theoretische und experimentelle Ergebnisse nach H. Jering (35)

H. Jering hat in seiner Dissertation die Möglichkeit der enzymatischen Abspaltung von synthetisch angebrachten Amino-Schutzgruppen von Proteinen *in vitro* untersucht.

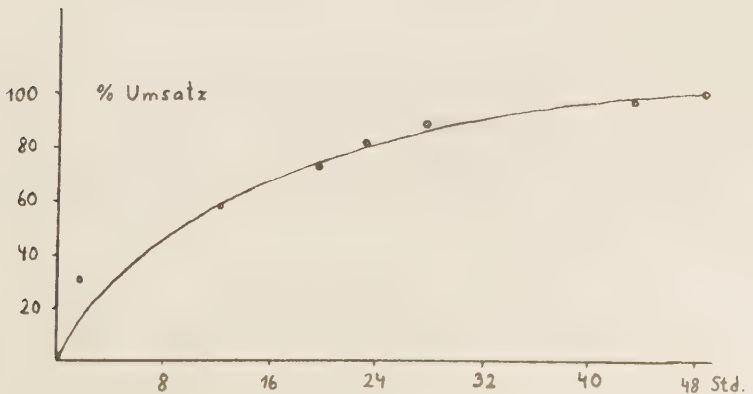
Bei der Herstellung eines TKI-Derivates mit geöffneter Lys - 15 - Ala - 16 - Bindung mußten die Argininreste modifiziert werden. Da bei dieser Modifizierung auch die ϵ -Aminogruppen reagieren und bei der Blockierung der ϵ -Aminogruppe von Lys - 15 durch große und hydrophobe Reste der Inhibitor inaktiviert wird, war eine reversible Aminoschutzgruppe erforderlich.

Als das für die Abspaltung der Acetylgruppe geeignete Enzym wurde die ϵ -Lysin - Acylase gefunden, und zwar in relativ hoher Konzentration in Rattennieren (36) und in Schweinenieren (37).

Das Enzym erscheint auch in kleinen Mengen in den meisten anderen Organen von Säugetieren und Vögeln (38).

Im Stoffwechsel des Organismus katalysiert das Enzym einen Schritt des Lysin-Abbaues (39). Auch in Mikroorganismen wurde das Enzym nachgewiesen (40,41). Diese Entdeckung war der erste Hinweis auf die enzymatische und damit spezifische Abspaltbarkeit von Acetyl- oder Acetoacetylgruppen von Lysinresten in Proteinen.

Beispiel für die Abspaltung der Acetylgruppe von Lys - 15 des TS - TKI durch ϵ -Lysin-Acylase aus Schweinenieren, verfolgt anhand der Zunahme der Inhibitoraktivität (35):



Ergebnis:

E - Lysin - Acylase katalysiert die Abspaltung der Acetyl - und weniger rasch (1/10 der Geschwindigkeit des Acetylrestes) der Acetoacetylgruppe von der **E** - Aminogruppe des Lys - 15 von TKI.

Damit wurde erstmals eine Schutzgruppe von einem chemisch modifizierten Protein enzymatisch in vitro abgespalten (35).

2. In vivo Versuche

Ziel meiner Versuche war es nun, zu zeigen, ob die Schutzgruppe auch in vivo abgespalten wird.

Nach Injektion von TS - TKI (aktiv) und Lys-15 acetyliertem TS - TKI (inaktiv) bei Ratten wurde ein ähnliches Ergebnis wie nach der i.v. Injektion von Tetramaleoyl-TKI erwartet (42).

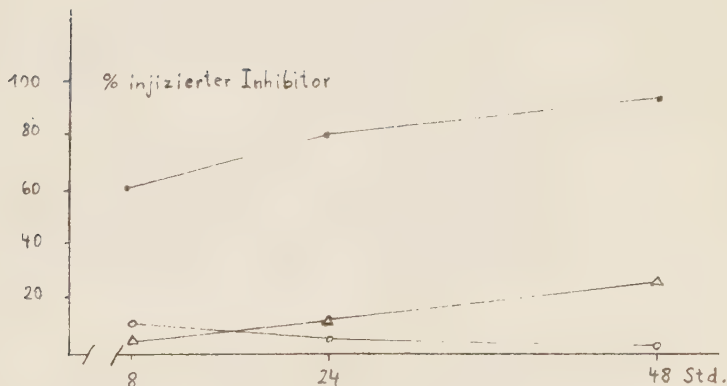
Hierbei waren nur maximal 6.5 % der inj. Aktivität in den Nieren (in der Leber maximal 3 %) gefunden worden, nach 4 Stunden post injectionem waren ca. 65 % der injizierten Aktivität im Harn nachweisbar, nach 24 Stunden 67 - 88 % .

Die Menge des TS - TKI und des Lys - 15 acetylierten TKI in der Leber und die Ausscheidung in den Urin nach 8, 24 und 48 Stunden sind in folgender Abbildung dargestellt.

Abb.: Verteilung und Ausscheidung von TS - TKI und Lys - 15 - acetyl TS - TKI in Ratten

- TS - TKI im Harn
- △ in vivo reaktivierter TS - TKI im Harn
- Lys - 15 - acetyl TS - TKI in der Leber

Angaben in % des injizierten Inhibitors (35).



TS - TKI wurde demnach ebenso schnell wie Tetramaleoyl-TKI in den Harn ausgeschieden.

Das acetylierte Derivat verhielt sich ähnlich.

Nach 48 Stunden wurden im Urin 30 % als aktiver TKI und 70 % als acetyliertes Derivat gefunden.

Die 30 % aktiver TKI müssen durch körpereigene ϵ -Lysin-Acylase aus der inaktiven Vorstufe gebildet worden sein.

In der Leber fand sich ein höherer Spiegel an acetyliertem TKI als für Tetramaleoyl-TKI gefunden wurde.

Die enzymatische Abspaltbarkeit der Acetyl-Schutzgruppe in vivo war somit nachgewiesen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurde die Organverteilung zweier ähnlicher Protease-Inhibitoren - 1) des Inhibitors aus Seeanemonen und 2) des Inhibitors aus Schnecken - nach i.v. Injektion bei der Ratte untersucht und mit der des Trasylol verglichen.

Beide Inhibitoren zeigen eine praktisch gleiche Verteilung:

Nach der raschen Eliminierung aus dem Serum kommt es zu einem geringfügigen Konzentrationsanstieg in Leber und Nieren, schließlich aber in einem Zeitraum bis zu 48 Stunden zu einer nahezu vollständigen (über 80 %) Ausscheidung der Hemmstoffe im Harn.

In der Harnausscheidung ergab sich der entscheidende Unterschied zu Trasylol, welches weitgehend in den Nieren fixiert wird.

Weitere Untersuchungen galten dem Verhalten

von modifizierten Protease-Inhibitoren im Organismus der Ratte ebenfalls nach i.v. Injektion.

Untersucht wurden:

- 1) Hemmaktives Tetrasuccinyl-Trasylol, welches ebenfalls zu über 80 % im Harn erscheint.
- 2) Inaktives Acetyl-Tetrasuccinyl-Trasylol, welches teilweise in den Nieren durch Deacylase aktiviert wird. Die restlichen 70 % des applizierten inaktiven Hemmstoffes wurden in unveränderter Form ausgeschieden.

DISKUSSION

Zwischen den drei Protease-Inhibitoren Trasylol^R, Inhibitor aus Seeanemonen und Inhibitor aus Schnecken besteht aufgrund der gemeinsamen homologen Struktur und des ähnlichen Hemmspektrums eine enge Verbindung.

Eine besonders hohe Übereinstimmung bezüglich des Hemmverhaltens besteht zwischen Trasylol und dem Inhibitor aus Seeanemonen, da beide Trypsin, Chymotrypsin, Kallikreine und Plasmin auch in quantitativer Hinsicht gleichstark hemmen.

Der Inhibitor aus Schnecken dagegen fällt, sein Hemmvermögen gegenüber Kallikrein betreffend, aus der Reihe, da seine Hemmwirkung gegen Kallikrein nur sehr schwach ist.

Der auffallendste physikalische Unterschied zwischen den drei Inhibitoren besteht in der Ladung. Am stärksten basisch ist Trasylol, weniger

basisch ist der Inhibitor aus Seeanemonen, während der Inhibitor aus Schnecken dagegen bereits relativ sauer ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem die Verteilung der Hemmstoffe nach i.v. Injektion in den Organen der Ratte untersucht. Dabei hat sich praktisch eine gleiche Organverteilung des Seeanemonen-Inhibitors und des Schnecken-Inhibitors ergeben.

Im Serum zeigen beide einen raschen Konzentrationsabfall. In Leber und Nieren läßt sich nur eine geringe initiale Speicherung nachweisen, während eine nahezu vollständige Ausscheidung im Harn nach 48 Stunden erfolgt. Hier zeigt sich ein deutlicher Vorteil im Vergleich mit Trasylol, welches im Gegensatz dazu in den Nieren fixiert wird. Außerdem ist bei Trasylol auch eine gewisse Speicherung des Inhibitors in den Organen Leber und Lunge zu beobachten.

In erster Linie kann man wohl für dieses unterschiedliche Verhalten bezüglich der Organverteilung die Ladungsunterschiede der

Hemmstoffe verantwortlich machen.

Dies läßt sich zum Beispiel auch dadurch bestätigen, daß die modifizierten aktiven Formen des Trasylol, wie Tetramaleoyl-Trasylol oder Tetrasuccinyl-Trasylol, ebenfalls nahezu quantitativ im Harn erscheinen.

Besonders interessant ist das Verhalten der acetylierten, inaktiven Form des Inhibitors, des Acetyl-Tetrasuccinyl-Trasylol. Erwartungsgemäß erscheint auch dieser Inhibitor im Harn, allerdings zum Teil in deacylierter Form.

Dies läßt darauf schließen, daß er in den Nieren in Kontakt mit Deacylase kommt, durch welche er von der inaktiven in die aktive Form verwandelt wird.

Mit diesem Nachweis der Aktivierung durch Deacylierung konnte erstmals ein Beispiel für die in vivo - Freisetzung der Hemmaktivität eines modifizierten, inaktiven Inhibitors

in einem bestimmten Organ erbracht werden.

Daraus könnten sich in der Zukunft Möglichkeiten entwickeln lassen, daß inaktive Formen von Hemmstoffen in bestimmten Organen freigesetzt, das heißt erst am Ort des Bedarfs chemisch in die aktive Form des Inhibitors umgewandelt werden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) Bauer, E., E.K. Frey, H. Kraut, F. Schultz,
E. Werle, Naturwiss. 17,672 (1930)
- 2) Kraut, H., E.K. Frey, E. Werle, Z. f. phys.
Chemie 192 (1930)
- 3) Trautschold, I., E. Werle, Z. f. physiol.
Chemie 325,48 (1961)
- 4) Werle, E., L. Meier, E. Ringelmann,
Naturwiss. 39,328 (1952)
- 5) Auhagen, J., Dissertation, Med. Akad.
Düsseldorf, (1964)
- 6) Kemkes, B.M., Dissertation, Univ. München, (1969)
- 7) Werle, E., I. Trautschold, H. Fritz, Neue Aspekte
der Trasytol Therapie I, 14 (1966)
- 8) Jering, H., Dissertation, Techn. Universität
München (1973)
- 9) Desnuelle, P. in: Boyer, Landy a. Myrbäck (eds)
"The Enzymes", vol. 4, p. 128, Academic Press,
New York (1960)
- 10) Willstätter, R. u. H. Rhodewald, Hoppe Seyler's
Z. f. physiol. Chemie 194,137 (1931)
- 11) Widmark, G.E., Hoppe Seyler's Z. f. physiol.
Chemie 207,182 (1932)
- 12) Buadze, S., Fermentforschung 14,56 (1934)
- 13) Cafiero, M., Arch. Sci. biol. 37,63 (1953)
- 14) Frey, E.K. u. H. Kraut, Z. f. physiol. Chemie
157,32 (1962)
- 15) Frey, E.K., H. Kraut u. E. Werle, "Kallikrein",
Euke Verlag, Stuttgart (1950)

- 16) Werle, E., u. P.v. Roden, Biochem. Z.
286,213 (1936)
- 17) Werle, E., R. Kehl u. K. Koebeke, Biochem. Z.
320,372 (1950)
- 18) Bhoola, K.D. a.M. Schachter, J. Physiol.
(Lond.) 149,80 F (1959)
- 19) Habermann, E., Arch. exp. Path. Pharmak.
245,230 (1963)
- 20) Anderer, E., Z. für Naturforschung 20 b,
462 (1965)
- 21) Kraut, H., W. Körbel, N. Scholtan, J. Schultz,
Z. f. phys. Chemie 321,90 (1960)
- 22) Trautschold, I., Habilitationsschrift,
Universität München (1965)
- 23) Bergmeier, Methoden d. Enzymat. Analyse
- 24) Kemkes, B.M., Dissertation München (1969)
- 25) Meckl, D.A., Dissertation, Universität
München (1969)
- 26) Béress, L. & Béress, R., Kieler Meeresforsch.
27,117-127 (1971)
- 27) Fritz, H., B. Brey, L. Béress, Z. f. phys.
Chemie 353,19-30 (1971)
- 28) Gibson, D. & Dixon, G.H., Nature (London)
222,753-754 (1969)
- 29) Oppitz, K.-H., Dissertation, Univ. München
(1969)
- 30) Werle, E., Appel, W. & Happ, E., Arch. exp.
Path. Pharmak. 234,364-372 (1958)
- 31) Tschesche, H., Dietl, T., Marx, R., Fritz, H.
Z. f. physiol. Chemie 353,483-486 (1972)
- 32) Tschesche, H. & Dietl, T., Eur. J. Biochem.
30,560-570 (1972)

- 33) Uhlenbruck, G., Sprenger, J. & Hermann, G.,
Z. klin. Chemie u. klin. Biochemie 9,494-496
(1971)
- 34) Dietl, Th., Diplomarbeit, Univ. München (1972)
- 35) Jering, H., Dissertation, Univ. München (1973)
- 36) Paik, W.K., L.B. Frankenthal, S.M. Birnbaum,
M. Winitz, J.P. Greenstein, Arch. Biochem.
Biophys. 69,56-66 (1957)
- 37) Paik, W.K., L. Benoiton, Can. J. Biochem.
Physiol. 41, 1643-1654 (1963)
- 38) Paik, W.K., Comp. Biochem. Physiol 9,13-22
(1963)
- 39) Paik, W.K., Biochem. Biophys. Acta 65,518-520
(1962)
- 40) Chibata, J., P. Tosa, T. Ishikawa, Arch. Bio-
chem. Biophys. 104,231-237 (1964)
- 41) Wada, S., J. Biochem (Tokyo) 46,445-452 (1952)
- 42) Fritz, H., K.H. Oppitz, D. Meckl, n. Haendle,
H. Schult, E. Werle, Z. f. Physiol. Chem.
350,1541-1550 (1969)

LEBENS LAUF

Ich wurde am 8.6.1947 in München als Tochter des Diplomvolkswirts Dr. rer. pol. Georg Schorp und seiner Frau Antonie geb. Froidl geboren.

Nach der Volksschule besuchte ich von 1957-59 das Gymnasium der Englischen Fräulein in München-Nymphenburg, danach das Elsa Brandström-Gymnasium in München-Pasing bis 1962 und anschließend bis zum Abitur im Jahre 1966 die Heimschule Kloster Wald in Hohenzollern, wo ich im Frühjahr 1967 auch die Gesellenprüfung als Kunstschreiner ablegte.

Nach 3 Semestern Germanistik und Anglistik wechselte ich an der Universität München ab Wintersemester 1968/69 zum Studium der Humanmedizin über. Im Herbst 1974 bestand ich dort das ärztliche Staatsexamen.

Nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit in der Klinik Höhenried der LVA Oberbayern und in der Chirurgischen Klinik Prof. Hart in München-Solln arbeitete ich seit Mai 1976 als Vollassistentin weiterhin in der letztgenannten Klinik.

